



ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»,
г. Красноярск,
Российская Федерация

Цель. Определить тип хемилюминесцентной реакции в зависимости от тяжести острого панкреатита.

Материал и методы. В исследовании участвовало 60 пациентов с диагнозом острый панкреатит в ферментативную фазу, средний возраст составил 44 года. Диагноз ставился на основании клинико-лабораторных показателей и данных инструментальных исследований, с использованием интегральных шкал оценки тяжести заболевания и общего состояния пациента. Регистрацию скорости образования активных форм кислорода осуществляли с помощью метода люминол-зависимой хемилюминесценции, оценивали показатели при спонтанной и индуцированной реакции.

Результаты. Установлено, что при легкой степени острого панкреатита происходит активация процессов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует увеличение генерации активных метаболитов, и в частности активных форм кислорода. Зарегистрировано увеличение максимального значения хемилюминесценции в 3,97 раза и площади под кривой в 2,56 раза на фоне сокращения времени выхода на пик реакции. При среднетяжелом остром панкреатите происходили изменения в хемилюминесцентной реакции, характеризующие ее как гипероксическую. Определяли повышение интенсивности реакции в 9,51 раза на фоне снижения времени выхода на пик в 3,11 раза. Тяжелая форма заболевания характеризовалась снижением генерации активных форм кислорода на фоне выраженного эндотоксикоза и характеризовала хемилюминесцентную реакцию как гипоксическую. Регистрировалось снижение максимального значения хемилюминесценции в 9,30 раза, симметричности кривой и времени выхода на пик реакции на фоне увеличения площади под кривой при спонтанной реакции в 1,39 раза.

Заключение. Проведенное исследование подтвердило, что изменения хемилюминесцентной реакции являются дополнительными критериями оценки тяжести острого панкреатита. При легком и среднетяжелом остром панкреатите преобладают процессы гиперпродукции активных форм кислорода. Тяжелый острый панкреатит характеризуется снижением образования активных форм кислорода, что проявляется гипоксическим типом хемилюминесцентной реакции.

Ключевые слова: острый панкреатит, диагностика, хемилюминесценция, активные формы кислорода, среднетяжелый острый панкреатит, интенсивность реакции, гипоксический тип

Objectives. To determine the type of chemiluminescent reaction depending on acute pancreatitis severity.

Methods. The patients (n=60, an average age made up 44 years) with an acute pancreatitis in the enzymatic phase were enrolled in the study. The diagnosis was made on the basis of clinical laboratory indices as well as on the data of instrumental investigations, using for estimation an integral disease severity scale and a patient's general condition. Registering generation rate of active oxygen forms was carried out by means of the method of luminol-dependent chemiluminescence; the indices of spontaneous and induced reaction were estimated.

Results. Activation of the lipid peroxidation processes occurred at mild form of an acute pancreatitis has been established resulting in the elevation of generation of active metabolites, and in particular, of active oxygen forms. The increase of the maximal value of a chemiluminescence by 3.97 fold and the area under the curve by 2.56 fold has been registered against the background of reducing time-to-peak response. In case of moderate forms of acute pancreatitis the changes occurred in chemiluminescent reaction characterized it as hyperoxemic one. The elevation of the reaction intensity by 9.51 times was established against the background of the reducing time-to-peak response by 3.11 fold. A severe form of the disease was characterized by the generation reduction of active oxygen forms against the background of the expressed endointoxication and characterized the chemiluminescent reaction as hypoxemic one. Decrease in the maximal value of a chemiluminescence by 9.30 fold the curve symmetry and reducing time-to-peak response was registered against the background of the elevation area under the curve at a spontaneous reaction by 1.39 fold.

Conclusion. The conducted study confirmed that the changes of chemiluminescent reaction may serve as additional criteria for severity evaluation of an acute pancreatitis. At mild and moderate forms of an acute pancreatitis, the processes of hyperproduction of active oxygen forms predominated. Severe acute pancreatitis is characterized by the production reduction of active oxygen forms that is manifested by hypoxemic type of chemiluminescent reaction.

Keywords: acute pancreatitis, diagnostics, chemiluminescence, active oxygen forms, moderate forms, reaction intensity, hypoxemic type

Введение

Актуальность исследования проблем диагностики и прогнозирования течения острого панкреатита обусловлена увеличением заболеваемости. Показанием к каждой десятой госпитализации в неотложной хирургии является острый панкреатит [1]. В последние годы наряду с ростом заболеваемости увеличивается удельный вес тяжелых форм острого панкреатита, которые составляют от 10 до 25% [2]. Несмотря на успехи современной интенсивной терапии, летальность при развитии тяжелых гнойно-деструктивных осложнений составляет по разным данным от 30 до 85% [3]. Широко известна концепция «обрыва панкреатита», свидетельствующая о том, что проведение адекватной терапии в первые 72 часа от начала заболевания имеет максимальный клинический эффект. Это обуславливает необходимость поиска наиболее ранних и эффективных маркеров тяжелого течения острого панкреатита [4].

Создано огромное количество прогностических шкал, лабораторных и инструментальных тестов для диагностики острого панкреатита. Более 20 лет обсуждается единый подход к диагностике и лечению острого панкреатита. Актуальным направлением в диагностике тяжелого острого панкреатита являются исследования, посвященные развитию вторичного иммунодефицита при воспалении в поджелудочной железе. Важной составляющей иммунитета является неспецифический иммунный ответ, проявляющийся активацией грануляцитарно-макрофагальных клеток при воспалительном процессе [5, 6].

Перспективным в изучении функциональной активности нейтрофилов является хемилюминесцентный анализ, основанный на определении активности генерации активных форм кислорода (АФК) клетками крови [7, 8]. Известно, что усиление хемилюминесцентного ответа происходит при воспалительных и стрессовых ситуациях на фоне активации свободно-радикальных процессов и угнетения антиоксидантной защиты [9, 10].

Цель исследования — определить тип хемилюминесцентной реакции в зависимости от тяжести острого панкреатита.

Материал и методы

В исследовании участвовало 60 пациентов с диагнозом острый панкреатит в ферментативную фазу заболевания. Используя лабораторные и инструментальные методы исследования, а также специфические для острого панкреатита шкалы: прогностическую схему, разработанную

в Санкт-Петербургском НИИ скорой помощи [11] и интегральную шкалу Ranson [12] — устанавливали диагноз заболевания и определяли его тяжесть. В зависимости от тяжести острого панкреатита, в исследовании было по 20 человек с легким, среднетяжелым и тяжелым острым панкреатитом.

Возраст пациентов составил от 24 до 77 лет, лиц мужского пола было 42 (70%), женского — 18 (30%). Этиологическим фактором в 39 случаях (65%) является билиарный, у 21 (35%) пациента — алкогольный генез.

Сравнение полученных результатов производили на основании показателей группы контроля. Контрольная группа включала в себя 40 практически здоровых человек.

Выделяли нейтрофилы путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина, остаточные эритроциты были удалены осмотическим методом. Производили подсчет жизнеспособных нейтрофилов в полученной суспензии.

Для регистрации скорости образования АФК использовался метод люминол-зависимой хемилюминесценции, основанный на фиксации потока фотонов, образующихся при окислении химического активатора реакции — люминола. Метод хемилюминесценции проводили с использованием полистироловых кювет, в которые вносили 200 мкл люминола, 100 мкл нейтрофилов крови, разведенной в 10 раз неокрашенным раствором Хенкса, 50 мкл взвеси частиц латекса размером 2,4 мкм, опсонированных инактивированной сывороткой от 10 доноров. Инкубация клеток крови для записи кинетики генерации АФК проводилась на аппаратно-программном комплексе «Хемилюминометр CL-3606—ПЭВМ» (СКТБ «Наука», Красноярск).

Анализировали следующие показатели: S — площадь под кривой, I max — интенсивность реакции, T max — время достижения I max, Simtr — симметричность хемилюминесцентной кривой, Shape1 и Shape2 — показатели степени остроты кривой на уровне $\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{3}$ величины I max.

В терапии острого панкреатита применяли инфузионные и дезинтоксикационные растворы, антибактериальные средства, ингибиторы протеаз, спазмолитики.

Полученные данные обработаны статистически. Характер распределения исследуемых величин оценивали на основании теста Шапиро-Уилкса. Исследуемые величины соответствовали нормальному распределению. Для всех показателей определяли средние значения (M), а также стандартное отклонение (s). Для оценки степени достоверности различий между группа-

ми использовали простой критерий Стьюдента (t). Уровень статистической значимости считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

При спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов крови пациентов с легким острым панкреатитом регистрировался гипероксический тип хемилюминесцентной реакции: увеличивалось максимальное значение хемилюминесценции и площади под кривой на фоне укорочения времени выхода на пик реакции. Показатели степени остроты кривой Shape1 и Shape2 увеличивались при спонтанной реакции. Установлено, что при сокращении времени выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции увеличивается площадь и снижается симметричности кривой.

Усиление реакции люминолом привело к увеличению интенсивности хемилюминесценции и площади под кривой, снижению симметричности реакции. При этом время выхода на пик было приближено к значениям контрольной группы, а показатель Shape1 и Shape2 достоверно возрос (таблица 1).

Тип хемилюминесцентной реакции при среднетяжелом остром панкреатите характеризовался как гипероксический. Проявлялся в

увеличении интенсивности реакции и снижении времени выхода на пик при спонтанной и усиленной люминолом хемилюминесценции. Показатели площади под кривой достоверно не изменялись при спонтанной реакции и увеличились при активации люминолом в 3 раза. Регистрировалось увеличение показателя симметричности при спонтанной хемилюминесценции и снижение при активированной. Показатель остроты кривой Shape1 при спонтанной реакции достоверно не изменялся и снижался при усилении люминолом, уровень Shape2 был снижен (таблица 2).

При тяжелом остром панкреатите определялось уменьшение генерации АФК, что выражалось в снижении интенсивности хемилюминесценции, симметричности кривой и показателей Shape1, Shape2 при спонтанной и активированной реакции. Регистрировались разнонаправленные изменения показателя площади под кривой: увеличение при спонтанной реакции и снижение при усилении. Время выхода на пик снизилось при спонтанной реакции и возросло при активированной (таблица 3). Преобладание деструктивных изменений приводит к снижению интенсивности хемилюминесцентной реакции, что объясняется поступлением в кровь из тканей продуктов некроза, угнетающих свечение.

Таблица 1

Показатели спонтанной и индуцированной люминолом хемилюминесценции нейтрофилов крови пациентов с легкой степенью тяжести острого панкреатита в ферментативную фазу ($M \pm s$)

Показатели	Группа контроля		Пациенты с легкой степенью тяжести	
	Спонтанная реакция	Индукцированная реакция	Спонтанная реакция	Индукцированная реакция
I max, имп/с	1545,25±35,98	3187,24±132,63	6138,25±125,52*	8157,52±537,83* **
S, имп	2,75E+06±0,82	1,97E+06±0,46	7,03E+06±2,28*	3,51E+07±0,94* **
T max, мин	13,67±4,25	27,94±5,47	4,57±1,53*	32,42±7,15**
Shape1	2,74E+00±0,58	5,13E+00±1,38	6,81E+00±2,23*	1,30E-01±0,36* **
Shape2	2,84E-01±0,74	6,92E-01±1,92	7,81E-01±3,25*	3,62E-01±0,98* **
Simtr	6,31E-01±1,72	14,61E-01±2,47	3,32E-01±0,45*	7,91E-01±1,78* **

Примечание: * — $p < 0,05$ между показателями клинических групп и группы контроля; ** — $p < 0,05$ между группами больных со спонтанной и индуцированной хемилюминесценцией.

Таблица 2

Показатели спонтанной и индуцированной люминолом хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов со среднетяжелым острым панкреатитом в 1-3-и сутки после поступления ($M \pm s$)

Показатели	Группа контроля		Пациенты со средней степенью тяжести	
	Спонтанная реакция	Индукцированная реакция	Спонтанная реакция	Индукцированная реакция
I max, имп/с	1545,25±35,98	3187,24±132,63	14672,67±278,92*	15214,43±1325,61*
S, имп	2,75E+06±0,82	1,97E+06±0,46	2,71E+07±0,71	7,01E+07±3,02* **
T max, мин	13,67±4,25	27,94±5,47	4,38±0,91*	4,01±1,35*
Shape1	2,74E+00±0,58	5,13E+00±1,38	2,41E+00±0,78	0,92E+00±0,02* **
Shape2	2,84E-01±0,74	6,92E-01±1,92	1,01E+00±0,35*	3,71E-01±0,82* **
Simtr	6,31E-01±1,72	14,61E-01±2,47	2,30E-01±0,67*	1,09E-01±0,37* **

Примечание: * — $p < 0,05$ между показателями клинических групп и группы контроля; ** — $p < 0,05$ между группами больных со спонтанной и индуцированной хемилюминесценцией.

Таблица 3

Показатели спонтанной и индуцированной люминолом хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с тяжелым острым панкреатитом в 1-3-и сутки после поступления (M±s)

Показатели	Группа контроля		Пациенты с тяжелым острым панкреатитом	
	Спонтанная реакция	Индуцированная реакция	Спонтанная реакция	Индуцированная реакция
I max, имп/с	1545,25±35,98	3187,24±132,63	166,33±10,97*	294,23±13,41* **
S, имп	2,75E+06±0,82	1,97E+06±0,46	3,81E+05±0,93*	1,11E+06±0,27**
T max, мин	13,67±4,25	27,94±5,47	4,01±0,83*	45,33±5,26* **
Shape1	2,74E+00±0,58	5,13E+00±1,38	2,91E+00±0,85	3,71E-01±0,92*
Shape2	2,84E-01±0,74	6,92E-01±1,92	1,41E+00±0,37*	5,61E-01±1,12**
Simtr	6,31E-01±1,72	14,61E-01±2,47	1,51E-01±0,37*	9,41E-01±2,41* **

Примечание: * — $p < 0,05$ между показателями клинических групп и группы контроля; ** — $p < 0,05$ между группами пациентов со спонтанной и индуцированной хемилюминесценцией.

Обсуждение

Современная концепция патогенеза развития острого панкреатита отводит ведущую роль инфильтрации нейтрофилами поджелудочной железы. Аггезия нейтрофильными лейкоцитами ацинарных клеток железы приводит к гибели клетки и является ключевым механизмом развития панкреонекроза [7].

Известны данные о благоприятном исходе заболевания при увеличении показателей метаболической активности нейтрофилов в фазу панкреатогенной токсемии [8], что согласуется с полученными результатами в данном исследовании.

Функциональная активация нейтрофилов в ферментативную фазу острого панкреатита сопровождалась усилением генерации активных метаболитов и в частности активных форм кислорода, что в свою очередь определяло тип хемилюминесцентной реакции. Данные изменения хемилюминесценции характерны для легкого и среднетяжелого острого панкреатита. Хемилюминесцентная реакция протекает по гипероксическому типу и характеризуется увеличением интенсивности реакции и площади под кривой.

Тотальный и субтотальный формирующий некроз в ткани поджелудочной железы, снижение иммунореактивности макроорганизма косвенно выражалось в функциональном истощении нейтрофилов. Также снижение интенсивности хемилюминесцентной реакции объясняется выходом в кровеносное русло низкомолекулярных пептидов, являющихся ингибитором хемилюминесценции.

Заключение

Использование хемилюминесцентного анализа является целесообразным в оценке функциональной активности нейтрофилов. Кинетика генерации активных форм кислорода

нейтрофилами отражает состояние неспецифической резистентности организма, а определение типа хемилюминесцентной реакции можно использовать как критерий прогнозирования тяжести заболевания.

Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого».

ЛИТЕРАТУРА

1. Фомин АВ, Гидранович АВ. Оценка тяжести состояния больных острым панкреатитом (обзор литературы). *Вестн ВГМУ*. 2004;3(1):41-50.
2. Фирсова ВГ, Паршиков ВВ, Градусов ВП. Острый панкреатит: современные аспекты патогенеза и классификации. *Соврем Технологии в Медицине*. 2011;(2):127-34.
3. Baddeley RNB, Skipworth JRA, Pereira SP. Acute pancreatitis. *Medicine*. 2011;39(2):108-15.
4. Ивлев ВВ, Варзин СА, Шишкин АН. Современные подходы к лечению больных острым деструктивным панкреатитом. *Вестн С-Петерб Унта*. 2013;11(1):122-26.
5. Кочетова ЛВ, Дунаевская СС. Метаболическая коррекция в комплексном лечении больных острым панкреатитом. *Казан Мед Журн*. 2011;92(3):315-18.
6. Тарасенко АВ, Алесеев СА. Экспресс-диагностика состояния Т-клеточного звена иммунитета и динамическая иммунокорректирующая терапия при остром деструктивном панкреатите. *Новости Хирургии*. 2010;18(3):47-57.
7. Балаклея ЕН, Славинский АА, Лищенко АН. Активация нейтрофильных лейкоцитов системы верхней и воротной вен у больных острым панкреатитом. *Кубан Науч Мед Вестн*. 2010;(9):31-33.
8. Нагоев БС, Юанов АА. Состояние функциональной и метаболической активности лейкоцитов у больных острым и хроническим панкреатитами. *Вестн Новых Мед Технологий*. 2006;13(4):113-15.
9. Weber H, Hühns S, Jonas L, Sparmann G, Bastian M, Schuff-Werner P. Hydrogen peroxide-induced activation of defense mechanisms against oxidative stress in rat pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic Biol Med*. 2007 Mar 15;42(6):830-41.
10. García-Hernández V, Sarmiento N, Sánchez-Bernal C, Matellán L, Calvo JJ, Sánchez-Yagüe J. Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and

PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb;1842(2):192-201. doi: 10.1016/j.bba-dis.2013.11.003.

11. Курыгин АА, Багненко СФ, Гринев МВ, Толстой АД, Лапшин ВН, Гольцов ВР, и др. Острый панкреатит (протоколы диагностики и лечения). *Хирургия Журн им НИ Пирогова*. 2005;(7):19-23.
12. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, FinkSD, Eng K, Spencer FC. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet*. 1974 Jul;139(1):69-81.

REFERENCES

1. Fomin AV, Gidranovich AV. Otsenka tiazhesti sostoiianiia bol'nykh ostrym pankreatitom (obzor literatury) [Assessment of the severity of patients with acute pancreatitis (review)]. *Vestn VGMU*. 2004;3(1):41-50.
2. Firsova VG, Parshikov VV, Gradusov VP. Ostryi pankreatit: sovremennye aspekty patogeneza i klassifikatsii [Acute pancreatitis: current aspects of pathogenesis and classification]. *Sovrem Tekhnologii v Meditsine*. 2011; (2):127-34.
3. Baddeley RNB, Skipworth JRA, Pereira SP. Acute pancreatitis. *Medicine*. 2011;39(2):108-15.
4. Ivlev VV, Varzin SA, Shishkin AN. Sovremennye podkhody k lecheniiu bol'nykh ostrym destruktivnym pankreatitom [Current approaches to the treatment of patients with acute destructive pancreatitis]. *Vestn Sankt-Peterburskogo un-ta*. 2013(11):122-126.
5. Kochetova LV, Dunaevskaia SS. Metabolicheskaia korrektsiia v kompleksnom lechenii bol'nykh ostrym pankreatitom [Metabolic correction in complex treatment of patients with acute pancreatitis]. *Kazanskii Meditsin Zhurn*. 2011;92(3):315-18.
6. Tarasenko AV, Aleseev SA. Ekspres-diagnostika sostoiianiia T-kletchnogo zvena immuniteta i dinamicheskaiia immunokorregiruiushchaia terapiia pri

ostrom destruktivnom pankreatite [Express diagnostics of the state of T-cell immunity and dynamic immunocorrective therapy at acute destructive pancreatitis]. *Novosti Khirurgii*. 2010;18(3):47-57.

7. Balakleets EH, Slavinskii AA, Lishchenko AN. Aktivatsiia neutrofil'nykh leukotsitov sistemy verkhnei polo i vorotnoi ven u bol'nykh ostrym pankreatitom [Activation of of neutrophil leukocytes of system of superior vena and portal vein in patients with acute pancreatitis]. *Kubanskii Nauch Meditsin Vestn*. 2010;(9):31-33
8. Nagoev BS, Iuanov AA. Sostoianie funktsional'noi i metabolicheskoi aktivnosti leukotsitov u bol'nykh ostrym i khronicheskim pankreatitami [Status of functional and metabolic activity of leukocytes in patients with acute and chronic pancreatitis]. *Vestnik Novykh Med Tekhnologii*. 2006;13(4):113-15.
9. Weber H, Hühns S, Jonas L, Sparmann G, Bastian M, Schuff-Werner P. Hydrogen peroxide-induced activation of defense mechanisms against oxidative stress in rat pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic Biol Med*. 2007 Mar 15;42(6):830-41.
10. García-Hernández V, Sarmiento N, Sánchez-Bernal C, Matellán L, Calvo JJ, Sánchez-Yagüe J. Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb;1842(2):192-201. doi: 10.1016/j.bba-dis.2013.11.003. Epub 2013 Nov 10.
11. Kurygin AA, Bagnenko SF, Grinev MV, Tolstoi AD, Lapshin VN, Gol'tsov VR, Krasnorogov VB. Ostryi pankreatit (protokoly diagnostiki i lecheniia) [Acute pancreatitis (medical guideline)]. *Khirurgiia. Zhurnal im NI Pirogova*. 2005.-N 7.-S.19-23
12. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, FinkSD, Eng K, Spencer FC. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet*. 1974 Jul;139(1):69-81.

Адрес для корреспонденции

660077, Российская Федерация,
г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1,
ФГБОУ ВО «Красноярский
государственный медицинский
университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»,
кафедра общей
хирургии им. проф. М.И. Гильмана,
тел. раб.: +963-191-29-70,
e-mail: Vikto-potapenk@yandex.ru,
Дунаевская Светлана Сергеевна

Сведения об авторах

Винник Ю.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. проф. М.И. Гильмана ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого».
Дунаевская С.С., д.м.н., доцент, профессор кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гильмана ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Поступила 6.10.2016 г.

Принята в печать 8.11.2016 г.

Address for correspondence

660077, Russian Federation,
Krasnoyarsk, Partizan Zhelezniak str., 1,
FGBOU IN «Krasnoyarsk State
Medical University named after
Prof. VF Voyno-Yasenetsky»,
Department of general
surgery named after prof. MI Gulman.
Tel.: + 963-191-29-70
e-mail: Vikto-potapenk@yandex.ru
Dunaevskaya Svetlana Sergeevna

Information about the authors

Vinnik Y.S. MD, Professor, Head of the general surgery department named after Professor M.I. Gulman, FSBE HE «Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky».
Dunaevskaya S.S. MD, Ass. Professor of the general surgery department named after Professor M.I. Gulman, FSBE HE «Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky».

Received 6.10.2016

Accepted 8.11.2016